RÉPUBLIQUE DU CAMEROUN
REPUBLIC OF CAMEROON
Peace – Work - Fatherland
UNIVERSITÉ DE DSCHANG
UNIVERSITY OF DSCHANG
Scholae Thesaurus
DschangensisIbiCordum
BP 96, Dschang (Cameroun) – Tél./Fax
(237) 233 45 13 81
Website:http://www.univ-dschang.org.
Email : udsrectorat@univ-dschang.org



FACULTE DES SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE
Département de Biochimie
Department of Biochemistry
BP 67, Dschang (Cameroun)
Tél./Fax (237) 243 691 506
E-mail : faculte.sciences@univ-dschang.org

Réalisation d'un Prélèvement Cervico Vaginal et d'un Antibiogramme

Rapport de stage effectué du 04 février au 04 mars 2019à l'Hôpital de District de Dschang

Par: **NJITOYAP NFOMBOUOT Philipe Herman**

Matricule: Cm-Uds15SCI1525

Licencié ès sciences

Option: Biochimie Clinique

Sous la direction

Académique de

Dr GOKA CHEKEM Marie

Chargé de cours

Professionnelle de

Mr TCHITECHOU Victor

Technicien médico sanitaire

Année académique 2018 - 2019

Remerciements

Au terme de ce stage, nous tenons à exprimer nos vifs remerciements au SEIGNEUR tout puissant qui qui nous a donné la Force, le Courage, l'Intelligence et la Sagesse d'accomplir ce travail.

Le dit travail a été réalisé au laboratoire de l'hôpital de district de Dschang. Nous exprimons notre profonde gratitude :

- au directeur de L'Hôpital de District de Dschang Dr MBOUTING Mayaka Georges et son personnel pour l'accueil qu'ils nous ont réservé.
- à ceux qui nous ont beaucoup appris au cours de ce stage et même ceux qui ont eu la gentillesse de faire de ce stage un moment très profitable notamment:

  Mr TCHITECHOU P Victor, Mr NDAM N Marcel, Mr SANDIE Isaac, Mme ABAMOT Irène.

À tous ceux qui nous ont soutenus dans nos études scolaires et universitaires.

À mon encadreur académique Dr GOKA Chekem Marie

À tous nos enseignants qui nous ont préparés théoriquement pendant ces trois années à l'université de Dschang.

Dédicaces

Je dédie ce travail à ceux qui de près ou de loin ont fait un sacrifice ou ce sont sacrifiées pour les sciences de la santé.

À ma famille, amis et connaissances

À ceux qui m'ont aidé à accomplir ce travail.

À tous ceux pour qui se sacrifient pour sauver des vies…

Liste des abréviations

AK: AMIKACINE

ASLO : Antistreptolysine O

BG^- : Bactérie Gram Négatif

BG^+: Bactérie Gram Positif

CFM: CÉFIXIME

CIP: CIPROFLOXACINE

CMB: Concentration Minimale Bactéricide

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

CN: CÉFALEXINE

CRO: CEFTRIAXONE

CRP: C Reactive Protein

DO: DOXYCYCLINE

ECBU: Examen CytoBacteriologique des Urines

ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FF: FLORFÉNICOL

FR: Facteur Rhumatoïde

HDD: Hôpital De District De Dschang

HIV: Human Immunodeficiency Virus

IMP: IMIPÈNE

LEV: LEVOFLOXACINE

LMD: LICENCE MASTER DOCTORAT

MI: MINOCYCLINE

NFS : Numération Formule Sanguine

NOR: NORFLOXACINE

OFX: OFLOXACINE

SXT: SULPHAMÉTHOXAZOLE + TRIMÉTOPRIME

TC: Temps de Coagulation

TOB: TOBRAMYCINE

TPHA: Treponema Palladium Hemaagglutination Assay

TS: Temps de Saignement

VDRL: Venereal Diseases Research Laboratory

Listes des tableaux

Liste des figures

Résumé

Le prélèvement génital consiste à recueillir quelques cellules ou des sécrétions vaginales dans le but de déceler une infection génitale.

Le prélèvement de cet échantillon se fait après le respect des conditions de prélèvement strictes. L'analyse microscopique de ce prélèvement se fait après avoir noté l'aspect macroscopique de l'échantillon.

Afin d'éviter toute résistance médicamenteuse, un antibiogramme est réalisé sur du Muller Hinton.

Mots clés: prélèvement vaginal, coloration de Gram, flore vaginale, antibiogramme, antibiotique, technique de diffusion en milieu solide.

Abstract

Genital harvesting involves collecting some cells or vaginal secretions for the purpose of detecting genital infection.

This sample is taken after strict sampling conditions have been met. The microscopic analysis of this sample is done after noting the macroscopic appearance of the sample.

In order to avoid any drug resistance, an antibiogram is performed on Muller Hinton.

Key words: vaginal sampling, Gram stain, vaginal flora, antibiogram, antibiotic, diffusion technique in solid medium.

Introduction Générale

L'un des objectifs de la réforme du système LMD est de lier la théorie à la pratique et ce à travers la professionnalisation des enseignements. Le stage académique est une période de formation qui n'offre non seulement l'opportunité de travailler en milieu professionnel mais aussi permet de ressortir après une analyse de situation du milieu professionnel une liste de problèmes.

Le chômage des étudiants, la compétitivité sur le marché de l'emploi sont les principales raisons ayant abouti à la professionnalisation des étudiants .pour remédier à ces problèmes le système LMD exige aux étudiants le stage académique leur permettant de se professionnaliser.

C'est dans l'optique de résoudre ce problème de professionnalisation qu'au cycle Master de la filière biochimie il est exigé aux étudiants concernés d'effectuer durant une période déterminée un stage académique qui leur permettra non seulement de confronter les réalités du terrain et de mettre en pratique les connaissances théoriques acquises lors des cours magistraux mais aussi les préparer à la recherche scientifique.

C'est ainsi que du 04 février au 04 mars nous avons effectué un stage académique au sein de l'hôpital de district de Dschang. Le quel avait pour objectif de maîtriser les consignes de sécurité en relation avec le choix d'une méthode d'analyse. Il s'agissait spécifiquement de :

- Comprendre et appliquer quelques consignes de sécurité pour garantir une analyse fiable d'une part d'un prélèvement vaginal et d'autre part d'un antibiogramme ;
- D'explorer les bases de choix des méthodes d'analyses d'une part d'un prélèvement vaginal et d'autre part d'un antibiogramme;
- Comprendre les étapes du cycle d'analyses : Pré-Analytique, Analytique et Post Analytique d'une part d'un prélèvement vaginal et d'autre part d'un antibiogramme;
- maîtriser les règles de l'interprétation des résultats d'un prélèvement vaginal ainsi que celui d'un antibiogramme.

Chapitre 1 : Présentation du lieu du stage et déroulement du stage

I. Présentation du lieu de stage

1. Historique

Inauguré le 28 novembre 1957 par Mr Ahmadou Ahidjo, Mr H Adama et Mr Rouegne, l'hôpital de district de Dschang est un service de santé publique situé dans la région de l'ouest Cameroun, département de la Menoua, quartier Foto juste à quelques mètres de l'entrée de l'université de Dschang.

2. Organisation de l'hôpital de district de Dschang

Constitué des services ci-après l'hôpital de district de Dschang est dirigé depuis 2012 par le docteur Mayaka Georges. ORL, Ophtalmologie, Santé Mentale, Médecine, Pédiatrie, Accueil, Chirurgie, UPEC, Maternité, Néonatologie, du Laboratoire, la Pharmacie.

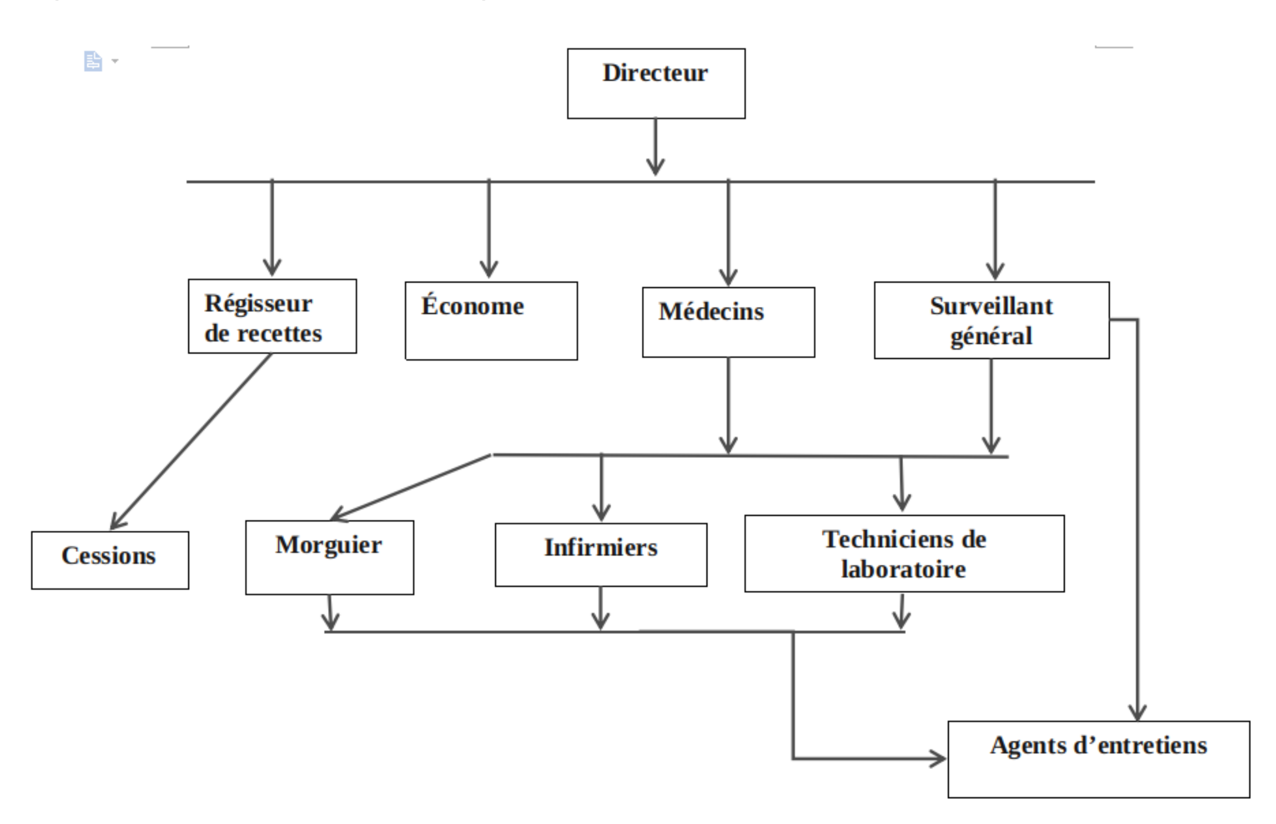


Figure 1: organigramme administratif de l'HDD

3. Organisation du laboratoire

Situé à côté de la morgue à la sortie ouest de l'hôpital, le laboratoire est divisé en quatre services sous la direction de Madame Kamnang Hortence:

– le service de bactériologie où sont réalisés les examens relevant de cet ordre il s'agit de :

ECBU, ECBU+ATB, PCV, PCV+ATB, Corpoculture, Corpologie, Spermogramme, Spermoculture, Liquide De Ponction, BAAR.

- le service de biochimie où es réalisé le dosage des paramètres biochimique comme:le dosage des ions, des enzymes, hormones, les lipides, le glucose plasmatique, bilirubine totale, bilirubine conjuguée. En outre, ce service effectue aussi les examens sérologique et immunosérologique il s'agit de: ELISA (Ag HCV ELISA, Chlamydia IgM/IgG, HIV ELISA, Toxoplasmose IgG/IgM, Rubéole), CD4§CD3, électrophorèse, NFS
- le service de parasitologie où sont réalisés les examens suivants: GE, TDR paludisme, Examens de Selles, Skin-Snip.
- le service de sérologie où les examens suivant sont réalisés: ASLO, HCV, TPHA,CRP, WIDAL, H. pylori, HCG, VDRL, HIV, FR, taux d'hémoglobine, TS, VS, TC,Groupe Sanguin + Rhésus, HbsAntigen.



Figure 2: vue externe du laboratoire de l'HDD

II. Déroulement du stage

Au cours de ces 4 semaines de stage, nous avons passé nos 2 premières semaines en bactériologie où nous avons réalisé les examens suivants: ECBU, ECBU+ATB, PCV, PCV+ATB, Corpoculture, Corpologie, Spermogramme, Spermoculture, Liquide de Ponction, BAAR.

La troisième semaine en biochimie où nous avons dosé les transaminases, les ions sériques, créatinine, urée, bilirubine totale et conjuguée, les examens relevant de la sérologie telle que l'électrophorèse de l'hémoglobine, la numération formule sanguine, CD4/CD3, Ag HCV ELISA, Chlamydia IgM/IgG, HIV ELISA, Toxoplasmose IgG/IgM, Rubéole.

La dernière semaine dans le laboratoire de Parasitologie/sérologie où nous avons effectué les examens suivants:

- Les examens immunochromatographiques tel que HIV, H pylori, HCG, TDR du paludisme,
- Les examens de titration comme le WIDAL, L'ASLO, LE FR, LA CRP
- La vitesse de sédimentation, le temps de coagulation, le temps de saignement ; les examens parasitologiques des selles, la goutte épaisse.

Chapitre 2 : réalisation d'un prélèvement cervico vaginal et d'un antibiogramme

Les infections génitales représentent un grave problème de santé publique de nos jours ; d'après l'OMS, plus d'un million de personnes contractent chaque jour une infection génitale.

Cette dernière résulte de la prolifération d'organismes tant commensaux que pathogène. Bien que ces infections touchent aussi bien les femmes que les hommes, les recherches montrent que les femmes sont plus susceptibles de contracter une infection génitale que les hommes. En outre, les complications des infections sont plus graves chez les femmes que chez les hommes et il est possible que les femmes enceintes transmettent l'infection à leur enfant.

C'est fort de ce constat alarmant que nous avons choisi de nous imprégner au sujet des infections génitales à l'hôpital de district de Dschang.

Il existe plus d'une trentaine de bactéries, virus, champignons et parasites qui ciblent l'appareil génital dont leurs détection se fait à l'aide d'un examen de laboratoire appelé prélèvement cervico vaginal ou vulvaire qui comporte la macroscopie, la microscopie, les cultures...

L'identification des pathogènes responsables de ces infections n'en est qu'une partie de la lutte contre ces pathogènes; nous nous intéresserons ici aux bactéries dont le choix d'un antibiotique à utiliser se fera après un antibiogramme.

Dans les lignes suivantes, nous nous parlerons des techniques utilisés lors du P.C.V d'une part et d'autre part de la réalisation d'un antibiogramme afin de déterminer le traitement approprié pour l'infection.

I. Revue de la littérature

Une flore vaginale normale ou physiologique est une flore où est retrouvée une cohabitation de différentes espèces bactériennes appelés bactéries commensales et qui sont inoffensives à l'état normal [1]. Cependant, la flore vaginale est peuplée par les BG^{+} qui sont commensale du vagin.

En effet, par leur pouvoir acidifiant et leur sécrétion de peroxyde d'hydrogène les lactobacilles inhibent la multiplication des pathogènes; Enfin des immunoglobulines, présentes dans les sécrétions vaginales viennent compléter la défense contre les espèces bactériennes.

La flore vaginale est acquise rapidement après la naissance et est soumise à d'importantes modifications en fonction des conditions environnementales, alimentaires, hygiéniques, climatiques et surtout en fonction de l'âge. Ce lien avec l'âge est dû à l'imprégnation hormonale en œstrogènes dont la sécrétion d'œstrogènes est associée à la synthèse de glycogène, substrat préférentiel des lactobacilles.

La flore vaginale peut devenir anormale si elle est déséquilibrée, on parle alors de vaginite ou de vaginose dont le dépistage se fait grâce à un examen de laboratoire appelé prélèvement cervivo vaginal chez la femme et prélèvement vulvaire chez la jeune fille.

Le prélèvement cervico vaginal est un examen bactériologique prescrit :

• devant une vaginite parasitaire (Trichomonas) ou bactérienne.

• Recherche d'une infection génitale à l'occasion d'une dysurie, de brûlures urinaires.

• Prélèvement systématique sur une lésion découverte lors de l'examen gynécologique.

• Recherche systématique chez la partenaire d'un patient souffrant d'une maladie sexuellement transmissible (MST).

• Dépistage d'une infection materno-fœtale (rupture prématurée de membranes, fièvre maternelle).

L'examen bactériologique comprend un examen macroscopique, des tests d'orientations, un examen cytologique, un examen microscopique après coloration, un examen microbactériologique sur culture et est suivi d'un antibiogramme ou d'un antifongigramme. Ceci est suivi de l'identification bactérienne au travers des tests d'identifications.

L'analyse biologique des sécrétions vaginales repose sur les étapes suivantes :

- l'examen macroscopique qui consiste en la description de l'apparence (jaunâtre, grisâtre, blanchâtre) et la détermination du pH des leucorrhées.

- L'examen cytologique consiste à effectuer, à l'aide du microscope, l'étude des cellules, des globules blancs et des globules rouge présents au sein du vagin. Il permet aussi la recherche d'agents infectieux et d'éléments témoins d'une mycose vaginale.[**2**]
- L'examen microscopique d'un frottis vaginal permet d'apprécier l'importance de la flore de Doderlein[**2**]. cette appréciation peut se faire :
  - ✓ en typant la flore:

Flore de type1 s'il y a essentiellement les bactéries gram positifs: ici, il y'a une prédominance des lactobacilles. L'implantation de ceux-ci étant liéeaux degrés d'imprégnation ostrogénique qui entraîne l'accumulation du glycogène. C'est la flore normale chez la femme en période d'activité génitale; c'est la flore la plus souvent retrouvée au cours de la grossesse.

Flore de type2 75% de bactérie gram positifs et 25% autres.

Flore de type3 50% de bactérie gram positifs et 50% autres

Flore de type4 25% de bactérie gram positifs et 75% autres

Les flores de type 1 et 2 sont des flores normales alors que celles de type 3 et 4 sont pathogènes.

toutefois, il y'a pas typage de la flore bactérienne si : Prélèvement vulvaire chez la fille, Présence les éléments responsable d'une vaginose (trichomonas vaginalis, candida albicans et gardnerellavaginalis) ou d'une cervicite (NeisseraGonorrhoreae , aux chlamydiae , aux mycoplasmes).[**3**]

  - ✓ en utilisant le score de Nugent qui divise la flore vaginale en trois groupes :

    Groupe 1 (score comprise entre 0 et 3) : flore normale, à prédominance de lactobacilles, parfois elle est associées à d'autres morphotypes bactériens mais présents en petite quantité

    Groupe 2 (score comprise entre 4 et 6) : flore intermédiaire, avec des lactobacilles peu abondants et associées à d'autres morphotypes bactériens peu différenciés en petite quantité. Il s'agit d'une flore vaginale altérée, mais elle n'est pas en faveur d'une vaginose bactérienne.

    Groupe 3 (score compris entre 7 et 10) : flore évocatrice d'une vaginose bactérienne. Les lactobacilles ont disparu, au profit d'une flore anaérobie abondante et polymorphe.[**4**]

- les tests d'orientation qui permettent de guider le technicien dans ces analyses et l'aideront dans l'interprétation des résultats. il y'a entre autre le test à la potasse, le test de filamentation ...
- L'examen micro-bactériologique consiste à ensemencer des milieux de culture avec les écouvillons qui ont servi au prélèvement. Ces milieux seront incubés à 37 °C pendant 24 heures ou plus. C'est à partir de ces cultures que se feront la recherche, l'isolement des

colonies et l'identification des germes. Il doit y avoir corrélation entre les germes observés lors de l'examen microscopique et les cultures.[2]

- L'antibiogramme (pour les bactéries) ou l'antifongigramme (pour les champignons) sont des examens qui ont pour but de tester la sensibilité des germes retrouvés aux antibiotiques/antifongiques habituels. Ils ne sont pas effectués systématiquement, mais seulement en fonction du germe retrouvé et sont utiles pour choisir un traitement efficace et / ou détecter certaines souches résistantes aux thérapeutiques habituelles.[2]

Le choix de l'antibiotique à prescrire est fonction du diamètre d'inhibition obtenu après culture, de la concentration d'antibiotique utilisé.
Un antibiotique peut avoir un grand diamètre d'inhibition et être inefficace. Ainsi les pathogènes peuvent être sensible, résistant et intermédiaire vis à vis d'un antibiotique.

- le test d'identification des micro-organismes pathogènes repose sur la mise en évidence de leurs caractères biochimiques de ces micro-organismes à savoir: la réduction de l'urée, le sorbitol, l'indole, ornithine décarboxylase... plusieurs tests d'identification sont disponibles sur le marché comme la galerie API 20E, l'Enterosystem 18R, Enterosystem 24R ...

Toute fois certaines bactéries ne sont pas identifiables avec ces méthodes classiques ; elles le sont plus tôt en biochimie en utilisant l'ELISA par exemple pour le Chlamydia.

II. Réalisation du PCV + ATB

1. Les Matériels

- Alcool 90°
- Cahier ou carnet du patient
- Embouts
- Fuschine
- Gants
- Lamelles
- Lamelles
- Lames
- Lames stériles
- Lugol
- Micropipette
- Millieu Columbia, Columbia + VCN, EMB, Chapman au Manitol, Sabouraud au Chloramphénicol
- pipette pasteur
- spéculum + écouvillon
- violet de gentiane
- Milieu Mueller – Hinton

Milieu standardisé de 4 mm d'épaisseur.

- Les disques d'antibiotiques

Pour cet antibiogramme, nous utiliserons les antibiotiques appartenant à plusieurs classes:

- les aminosides: AK, TOB
- quinolones: LEV, OFX, CIP, NOR, MI, NA, FF
- Béta lactamines: IPM (carbapénème), CN, CRO, CFM (céphalosporines)
- Tétracyclines: DO

Ils doivent être conservés à 2 - 8 °C avec un déshydratant.

Le diamètre des disques est de 6,35 mm.

- Inoculum

L'inoculum est calibré de façon à obtenir après incubation des colonies juste confluentes.

2. réalisation du PCV

a. Condition de prélèvement :

- pas de prise d'antibiotiques (si oui attendre 4 jours) ;

- pas de rapport sexuel depuis 24h;

- pas de toilette intime le matin ;

- pas de saignement (menstruel) si oui attendre 2 jours après le saignement ;

- n'avoir pas uriné récemment (si oui attendre 3 heures de temps, avant de prélever).

b. Prélèvement

La patiente est en position gynécologique sur une table.

- introduire verticalement, délicatement et en position fermée dans le vagin le spéculum enprenant appui sur le bas de la fourchette.
- Lorsqu'il est introduit au 3/4, le retourner délicatement afin de le mettre en positionhorizontale.
- Presser légèrement le spéculum avec la main pour écarter les parois afin de visualiser le col de l'utérus; Lorsque il est repéré, stabiliser le spéculum.
- Avec le premier écouvillon, prélever autour du col (la paroi).
- Avec le deuxième écouvillon, prélever délicatement le col lui-même en appuyant fermement l'écouvillon sur l'orifice et en lui imprimant un mouvement rotatif. Si il y a du mucus sur l'orifice (phénomène physiologique) l'enlever grâce à une gaze stérile montée sur une pince avant de prélever.
- Replacer les écouvillons dans leur étui sans toucher l'ouverture.
- Retirer le spéculum en commençant par le dévisser un peu (pas jusqu'au bout, cela pourrait coincer de la muqueuse vaginale entre les mors du spéculum) puis en le tirant tout en effectuant un quart de tour pour le remettre en position verticale. Le placer dans une poubelle.[**5**]

c. Analyse

Il est important de noter qu'avant toute analyse le prélèvement doit être ensemencé sur des milieux de cultures appropriés.

i. examen macroscopique

- L'aspect du col au prélèvement doit être décrit pour le compte-rendu final de l'examen.
- Quantifier les leucorrhées.
- Le test à la potasse ou sniff test (mode opératoire): ajouter quelques gouttes de l'hydroxyde de potassium (KOH) à 10 % à un échantillon de sécrétions vaginales afin de déterminer la présence de bactéries qui libéreraient des amines, caractérisées par une odeur de poisson pourri. Cette odeur de poisson pourri très évocatrice de la présence conjuguée d'anaérobies et de Gardnerella vaginalis.

ii. examen microscopique

- étaler l'écouvillon de la paroi sur deux lames dont l'une sera pour l'état frais etl'autre pour l'état coloré (coloration de gram).
- étaler l'écouvillon du col sur une lame pour état coloré (coloration de gram).
  - ✓ État frais (mode opératoire): mettre une goutte d'eau physiologique sur la lame et la recouvrir d'une lamelle puis passer à l'observation microscopique x40 puis x100. Les éléments susceptible d'être trouvées cellules épithéliales, leucocytes, germes mobiles, éléments leuvuriformes, trichomonas vaginalis...
  - ✓ État coloré : Faire la coloration de gram ;

Réalisation de la coloration de Gram (mode opératoire)

- après fixation à la flamme, recouvrir la flamme de violet de gentiane fraîchement filtré;
- laisser agir pendant une minute puis laver à l'eau propre et égoutter;
- recouvrir la lame de lugol (mordançage au lugol) et laisser agir pendant une minute;
- laver la lame à l'eau propre et égoutter;
- tenir la lame incliné et faire couler pendant quelques secondes de l'alcool à 90° (solution de décoloration) jusqu'a écoulement incolore;
- rincer immédiatement à l'eau et égoutter
- recouvrir la lame de fuchsine , laisser agir pendant une minute puis rincer à l'eau et égoutter;
- sécher à l'air libre à l'abri des insectes.

Après séchage, poser une goutte d'huile à immersion puis passer à l'observation microscopique x100.

Noter l'état des cellules épithéliales, polynucléaires (altérées, non altérées, plus ou moins altérées) en fonction de la coloration et de la forme des éléments, dire s'il s'agit des bactéries gram positifs ou négatifs, des coccis gram positifs ou négatifs ;

iii. culture

- ensemencer l'écouvillon du col sur le milieu Columbia et Columbia additionné du VCN par des zigzags ascendants, en prenant soin de ne pas abîmer le milieu et incuber pendant 24h ou plus en anaérobie.
- ensemencer l'écouvillon de la paroi sur les milieux EMB (La gélose EMB est utilisée pour différencier les entérobactéries), Chapman + manitol (milieu sélectif des staphylocoques qui différencie la fermentation du mannitol permettant une orientation entre autres vers Staphylococcus aureus), et Sabouraud + chloramphénicol (La gélose de Sabouraud au Chloramphénicol est recommandée pour l'isolement des levures et des moisissures) par des zigzags ascendants, en prenant soin de ne pas abîmer le milieu et incuber pendant 24h ou plus.

iv. le gram de contrôle

Après une culture bactérienne, il est nécessaire de faire un gram de contrôle sur les colonies présentes afin de savoir quelle famille bactérienne.

NB: la numération des colonies dans un milieu tient une place de choix dans la suite de l'analyse car en nombre exponentiels, certaines bactéries commensales sont jugées pathogènes même dans leur milieu de prédilection (le seuil pathologique étant 10^4 UFC)

Mode opératoire du Gram de contrôle

Prélever une colonie bactérienne du milieu de culture puis étaler sur la lame et faire la coloration de gram.

Une fois la famille bactérienne connue s'il s'agit d'une famille pathogène, on procède à un antibiogramme.La sensibilité aux antibiotiques nous permettra d'avoir une idée sur le traitement du patient.

3. Antibiogramme par diffusion en milieu solide

a. Généralités sur l'antibiogramme

L'antibiogramme est un test bactériologique permettant d'évaluer la sensibilité de bactéries vis à vis d'un antibiotique. Il a pour but de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques afin d'adopter une meilleure antibiothérapie dans un processus infectieux. L'antibiotique est une substance d'origine naturelle ou synthétique capable à faible concentration d'inhiber la croissance ou de tuer une bactérie et doué d'une toxicité sélective.
Le choix d'un antibiotique se fait en fonction de la souche bactérienne qui a été isolé car tous les antibiotiques n'ont pas le même spectre d'action (d'autres agissent sur les Gram positifs, d'autres sur les Gram négatifs...), ni les mêmes caractéristiques (CMI, CMB).

i. principe

Des disques de papier buvard, imprégnés des antibiotiques à tester, sont déposés à la
Surface d'un milieu Mueller-Hinton par exemple, préalablement ensemencé avec un inoculum issu d'une culture. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme dans le milieu. Après 24heures d'incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de croissance et les diamètres des zones d'inhibition mettent en évidence la sensibilité du germe vis à vis de l'ATB testé.

ii. Différents antibiotiques utilisés et mode d'action

Les antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme appartiennent à plusieurs familles d'antibiotiques et peuvent aussi être des associations d'antibiotiques.

- Les béta lactamines aux quels appartient les céphalosporines de premières, deuxième, troisième génération et les pénicillines. ils inhibent la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne après fixation aux protéines de liaison de la pénicilline (PLP), ce qui entraîne l'arrêt de la biosynthèse (du peptidoglycane) de la paroi cellulaire, et conduit à la lyse et la mort de la cellule bactérienne.
- les aminosides sont les antibiotiques à large spectre, habituellement bactéricide.Ils sont principalement actifs sur les Gram négatifs comme les entérobactéries, sur bacille gram positifs, les corynébactérie, sur les cocci gram positif et négatifs et sur les mycobactéries.

  Ces antibiotiques franchissent par voie de porines la membrane externe, par un phénomène actif la membrane cytoplasmique et atteint le cytoplasme où a lieu la synthèse protéique.

  Elle agit principalement en bloquant la synthèse des protéines, altérant ainsi la perméabilité de la membrane cellulaire, entraînant la rupture progressive de l'enveloppe

cellulaire puis éventuellement la mort de la cellule. Elle possède une action bactéricide à des concentrations égales ou légèrement supérieures aux concentrations inhibitrices.

- la famille des tétracyclines: ce sont les antibiotiques à larges spectres, bactériostatiques vis à vis de nombreux Gram positif et Gram négatifs.

  Elle inhibe la synthèse protéique des bactéries: elles traversent la membrane externe par voie de porines ou directement à travers le couche de phospholipides, franchissent la membrane cytoplasmique par diffusion passive et se fixent au ribosome au niveau du site A par liaison avec les protéines de la sous unité 30s. Cette fixation empêche celle de l'aminoacylARNt et bloque l'étape de reconnaissance de la phase d'élongation peptidique.

- la famille des quinolones (ils inhibent la réplication de l'ADN) : agissent seulement sur les bactéries gram négatif. ils inhibent la synthèse d'ADN par action sur les topo-isomérase bactériens.
- association d'antibiotiques : cette association a pour but d'élargir le spectre d'action des antibiotiques et d'éviter les résistances. L'association sulfaméthoxazole + trimétoprime inhibe le fonctionnement de la dihydrofolate réductase qui catalyse la réduction du dihydrofolate en tétrahydrofolate. Le tétrahydrofolate est la vitamine B9 nécessaire à la synthèse des bases puriques, pyrimidiques et des acides aminés, en permettant l'incorporation de groupement à une unité carbone. Le triméthoprime agit donc par inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines des souches sensibles.
  Son association avec le sulfaméthoxazole(sulfamide) rend l'inhibition de la croissance des bactéries plus efficace. Le sulfaméthoxazole est un analogue de l'acidepara-amino-benzoïque, constituant avec les ptérines des dihydrofolate. Le sulfaméthoxazole agit au niveau de la synthèse des dihydrofolate puis le triméthoprime au niveau de la réduction en tétrahydrofolate. L'association bloque ainsi la synthèse de tétrahydrofolate, conduisant à la mort des cellules bactériennes.

b. Mode opératoire

i. Réalisation d'une suspension d'opacité équivalente à 0,5 Mac Farland

- ✓ Prélever sur le milieu de culture, un nombre de colonies suffisant afin d'obtenir 5 mL desuspension en eau physiologique d'opacité équivalente à celle de l'étalon 0,5 Mac Farland c'est-à-dire à environ 10^8 bactéries par mL.
- ✓ Ajustement de l'inoculum afin d'obtenir un tapis de colonies jointives : Réaliser une dilution au 1/10 de la suspension précédente (introduire 1 mL de la suspension d'opacité

équivalente à 0,5 Mac Farland dans un tube à essai contenant 9 mL d'eau physiologique) ; on obtient une suspension ajustéeà environ 10^7 bactéries par mL.

ii. antibiogramme

- ensemencer par inondation 1ml d'inoculum bactérien sur le MullerHinton et retirer l'excès d'inoculum en inclinant la boite et en ré-aspirant à l'aide d'une pipette pasteur.
- mettre le milieu à l'incubateur pendant un quart d'heure et le retirer.
- placer aseptiquement à 15mm de la périphérie les disques d'antibiotiques à l'aide d'une pince stérilisée à la flamme.
- appuyer légèrement sur le disque pour s'assurer du contact avec le milieu.
- incuber pendant 24h.

III. Les résultats du PCV et l'antibiogramme

1. Résultats du PCV

Nous avons reçu 26 patients chez les quelles on prescrit le PCV + antibiogramme.

Nous notons 6 flore de type 1, une flore de type 2, 7 de type 3 et 12 de type 4.

- dans la flore de type 1 on note une prédominance des bactéries gram positif (4) par rapport à celle de type gram négatif (2)
- dans la flore de type 2 on note une quantité égale de bactérie gram positif et gram négatif
- dans la flore de type 3 nous avons une prédominance de bactérie gram négatif (8) par rapport au gram positif (5)
- dans la flore de type 4 nous avons une prédominance de bactérie gram négatif (12) par rapport au gram positif (8)

Table 1: résultats du Gram

flore	flore de type 1		flore de type 2		flore de type 3			flore de type 4		
nombre	6		1		7			12		
	4 BG^+	2 BG^-	1 BG^+	1 BG^-	5 BG^+	7 BG^-	1 CG^-	1 BG^+	12 BG^-	7 CG^+

2. L’antibiogramme

Nous avons pris le cas d’un antibiogramme réaliser afin d’éradiquer les bactéries gram négatifs.Pour chaque antibiotique nous avons obtenu un diamètre d’inhibition qui est résumé dans les tableaux ci-dessous et représenté par les figures en dessous.

Table 2: résultats de l'antibiotique 1

ATB	STX 24	NOR 10	CIP 5	OFX 5	LEV 5	NA 30	CRO 5
Diamètre	14.3	30	31	25	29	21	19.9

Table 3: résultats de l'antibiogramme 2

ATB	AK 30	F 300	MI 30	TOB 30	CN 30	CFM 5	IMP 10	FF 50
Diamètre	16.8	16	13	14	16	17.5	25	9



Figure 3: résultats de l'antibiogramme avec les antibiotiques AK, CN, TOB, F, DO, MI

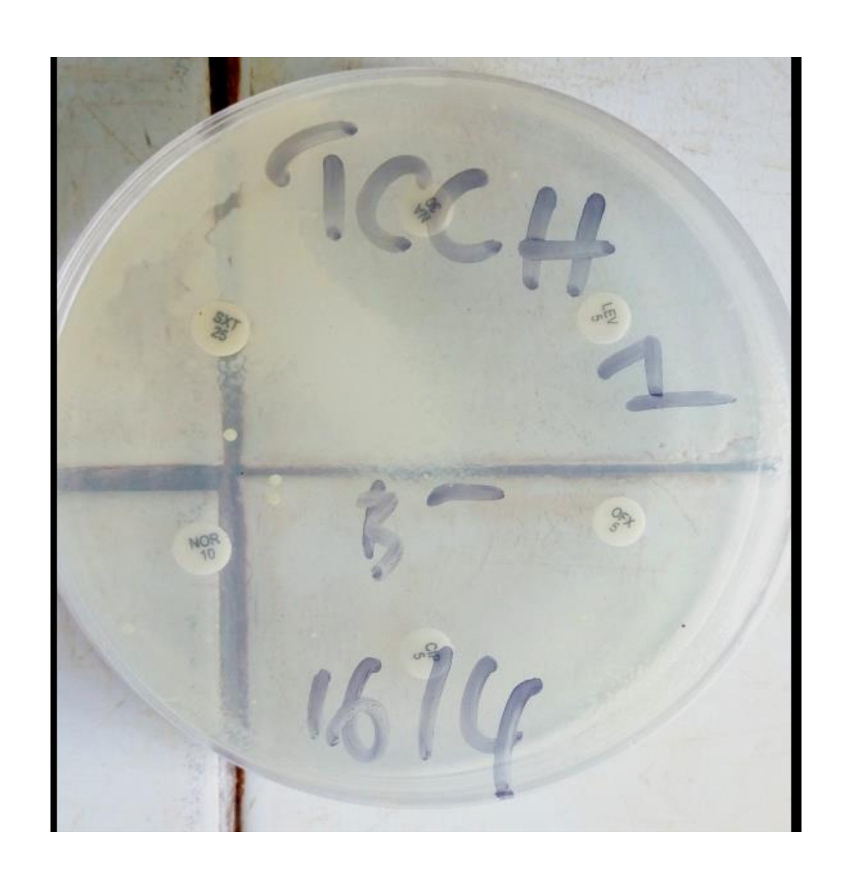


Figure 4: résultats de l'antibiogramme avec les antibiotiques NOR, SXT, LEV, NA, OFX, CIP



Figure 5: résultat de l'antibiogramme avec les antibiotiques FF, CFM, IPM, CRO

Le diamètre de la zone d’inhibition dépend de la sensibilité de la bactérie à l’antibiotique.

IV. Discussion

– examen après coloration de Gram

L'analyse des résultats montre une prédominance de la flore de type IV suivie de celle de type III; les flores de type I et II étant constitués essentiellement de lactobacilles sont considérées comme les flores normales.

Les flores de type III et IV sont dû à un déséquilibre du pH vaginal(le pH est normalement acide) qui entraîne la croissance des bactéries pathogènes. Ceci peut avoir pour origine:

- l'absence d'hygiène vaginale
- les rapports sexuels fréquents: le sperme étant basique, il contribue à augmenter le pH vaginal et favoriser la croissance des bactéries qui ne peuvent pas croître au pH normal du vagin.
- L'utilisation de certains produits cosmétiques pour la toilette vaginale.

Il est important de noter que le manque d'information de la part des patients et de la sensibilisation quant à l'hygiène vaginale est un facteur de la prévalence des flores de type III et IV chez les patients en consultation à l'HDD.

La flore vaginale est peuplé majoritairement par les lactobacilles et constituent la flore normale. Au cours de notre stage, nous avons trouvé une prédominance de BG^- ; ceci s'explique par les modifications des conditions du milieu vaginal qui ont favorisées le développement des bactéries BG^- au détriment des lactobacilles.

on constate que les colonies issue de la culture excèdent rarement les 10^4 colonies ceci peut être dû au fait qu'on soit en début d'infection ou qu'une automédication aurait réduit la quantité de germes présent.

Le résultat de la culture pour le patient choisi dont la flore était celle de type IV a montré qu'il s'agissait des BG^- dont la présence est anormale dans le vagin

Le rétablissement de la flore se fait par les antibiotiques qui ont été choisis après antibiogramme.

Les résultats de l'antibiogramme montrent

– une sensibilité à: LEV, NOR, CIP, OFX, NA, IPM, CFM, CRO, AK c'est à dire que il suffit d'une faible concentration d'un de ces l'antibiotiques pour tuer les bactéries et la dose nécessaire est administrable chez l'homme [**5**].

  La sensibilité peut être dû au fait que le pathogène n'a jamais été en contact avec l'antibiotique et n'a pas développé des résistances. En outre, le fait que le pathogène soit

sensible peut être dû au fait que l'antibiotique a ciblé un constituant essentiel de la bactérie ce qui a entraîner sa mort.

- une résistance à F, DO, MI, TOB, CN, SXT c'est à dire que la dose de l'antibiotique nécessaire pour tuer les bactéries est beaucoup trop élevée pour être supportée chez l'homme sans effets secondaires majeurs. Un tel antibiotique ne peut donc être utilisé pour traiter l'infection[**6**] .

  La résistance du pathogène peut s'expliquer par le fait que les antibiotiques utilisés n'avait pas de cible chez la bactérie en question ou qu'ils aient déjà été en contact avec l'antibiotique lors d'une automédication ou lors d'une prescription par les médecins et dont le patient n'a pas respecté la posologie.

- la souche testée est intermédiaire pour les antibiotiques CFM, CRO, AK c'est à dire que la dose de l'antibiotique nécessaire pour tuer les bactéries est tantôt administrable chez l'homme, tantôt dangereuse. Il faut donc considérer que la bactérie est résistante *in vivo*, c'est-à-dire dans l'organisme[**6**] .

Conclusion générale et perspectives

il était question pour de Comprendre et appliquer quelques consignes de sécurité pour garantir une analyse fiable d'une part d'un prélèvement vaginal et d'autre part d'un antibiogramme ; D'explorer les bases de choix des méthodes d'analyses d'une part d'un prélèvement vaginal et d'autre part d'un antibiogramme; Comprendre les étapes du cycle d'analyses : Pré-Analytique, Analytique et Post Analytique d'une part d'un prélèvement vaginal et d'autre part d'un antibiogramme; maîtriser les règles de l'interprétation des résultats d'un prélèvement vaginal ainsi que celui d'un antibiogramme.

Ce stage nous a rapporté beaucoup de connaissance concernant le monde du laboratoire, sa structure, son fonctionnement et surtout son activité.Les analyses effectuées permettent le diagnostic et la prise en charge thérapeutique. Il est très important de bien maîtriser les étapes des examens d'un prélèvement vaginal et d'un antibiogramme produire les résultats fiables et de bien diriger une antibiothérapie afin de lutter de manière efficace contre les infections génitales chez la femme. Notre passage au laboratoire de l'hôpital de district de Dschang a été bénéfique dans la mesure où nos objectifs en termes de compétence ont été atteints au cours de ce stage.

nous espérons que dans un futur proche l'hôpital de district de Dschang pourra acquérir un appareil comme celui de la PCR qui leur permettra non seulement d'alléger le travail car elle est largement utilisée à des fins de diagnostic pour détecter la présence d'une séquence d'ADN spécifique de tel ou tel organisme dans un spécimen biologique, mais aussi leur permettra d'être rapide dans le rendu des résultats vu le nombre des patients qu'ils ont.

Difficultés, limites et recommandations

Ce stage bien qu'instructif n'a pas été réalisé sans surmonter quelques difficultés notamment:

- le manque d'eau potable

Comme solution nous proposons au directeur de l'hôpital

- de réviser le système d'alimentation en eau du laboratoire ou de doter le laboratoire d'un filtre à eau.

En dehors de ces problèmes, aucune autre difficulté n'a affecté notre stage et nous félicitons le personnel de laboratoire pour tout cela.

References bibliographiques

[1]Monica Cheesbrough. Chapter 7: microbiological test: Examination of urogenital specimens. in , District Laboratory Practice in Tropical Countries, Part 2 Second Edition, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, New York, 2006, pp. 90-97.

[2]Le FIGARO. Actualité santé. http://sante. lefigaro.fr/sante/analyse/prélèvement-vaginaux/quest-ce-que-lexamen-bacteriologique-vaginal.

[3]René Caquet Avec la collaboration d'Anne Bru, Guide infirmier des examens de laboratoire, Issy-les-Moulineaux, Elsevier Masson, 2008, 385p.

[4]Alyabbara : Évaluation du score de Nugent de la flore vaginale

http://www.aly-abbara.com/livre_gyn_obs/termes/hygiene/flore_vaginale/score_nugent.html.

[5]Global Link for Online Biomedical Expertise. Sciences et Activités des laboratoires de Biologie. https://www.globe-network.org/fr/biologie/enseignement-a-distance/fiches-techniques-et-procedures/biotrop/prelevement-vaginal-et-uretral.

[6] Passeport sante. https://www.passeportsante.net/fr/Actualites/Dossiers/DossierComplexe.aspx?doc=interpreter_analyse_urine-les-resultats-de-l-antibiogramme.

Annexes



Matériels informatique du laboratoire de bactériologie



Incubateur



Bain marie



Étuve



Autoclave



Balance à gauche

Centrifugeuse à droite



Galerie Enterosystem 18 R



Bec bunsen ; spéculum sur un portoir



Milieux de culture



Table de prélèvement du PCV



Vue externe du laboratoire de bactériologie